

Г. Х. Бунятян, академик АН Армянской ССР, и Дж. А. Акопян

**Роль глутаминовой кислоты как источника
 свободного аммиака в мозговой ткани**

(Представлено 10/V 1967)

Одним из важных вопросов биохимии мозга является образование и устранение аммиака в мозговой ткани. Несмотря на многочисленные исследования, в настоящее время не все источники аммиака в мозгу изучены. В частности спорным является вопрос о роли глутаминовой кислоты (ГК) как источника аммиака через ее деаминирование. Рядом авторов выявлено наличие глутамат-дегидрогеназы в животных тканях, в том числе и в головном мозгу, хотя активность ее в мозгу значительно ниже, чем в печени (1,2).

Некоторыми исследователями доказано, что активность глутамат-дегидрогеназы наиболее выражена в сером веществе и особенно в двигательных центрах головного мозга (3,4).

Многие исследователи считают, что наряду с глутамином и адениловыми соединениями ГК играет важную роль в продуцировании свободного аммиака в мозгу путем окислительного деаминирования.

Однако работами ряда авторов (1, 5,6) показано, что окисление ГК в мозгу не сопровождается выделением свободного аммиака. Далее было обнаружено, что константа равновесия глутамат-дегидрогеназной реакции резко смещена в сторону восстановительного аминирования α -кетоглутаровой кислоты, особенно при наличии незначительных количеств аммиака (2, 7).

Установлено, что ГК в мозговой ткани в основном окисляется через аспартат (АК) и лишь незначительная ее часть окисляется другими путями (8, 9).

Согласно исследованиям Катунумы и сотр., ГК, добавленная к митохондриям печени, всецело превращается в АК. При добавлении же малоната количество свободного аммиака увеличивается соответственно повышению концентрации добавленной ГК, которое, по их данным, происходит под действием глутамат-дегидрогеназы (10).

По данным Балаша и сотр., под действием малоната ингибируется превращение ГК в АК также в нервной ткани и при этом отмечается образование некоторого количества свободного аммиака (9).

Таким образом в мозговой ткани, где активность глутамат-дегидрогеназы невысокая и ГК в основном превращается в АК, вопрос непосредственного деаминирования ГК и интенсивности этого процесса в нормальных условиях остается открытым. Перед нами была поставлена задача изучить, в каких условиях ГК сама по себе может служить непосредственным источником аммиака. Для этой цели мы изучали действие различных ингибиторов процесса трансаминирования на образование аммиака при добавлении ГК. Кроме аммиака мы определяли содержание ГК, АК и глутамина.

Опыты ставили на белых крысах весом 150—200 г. Срезы коры головного мозга готовили на холоду по методу Мак-Ильвейна, инкубировали в фосфатном буфере (рН—7,4), который содержал в миллимолях: NaCl—98, KCl—27, MgSO₄·7H₂O—12, KH₂PO₄—4, Na₂HPO₄—17,5.

200 мг срезов коры головного мозга инкубировали в 2 мл среды в присутствии кислорода в сосудиках Варбурга при 37°C. В инкубационную среду, в зависимости от характера опыта, добавляли гидроксилламин, кетокислоты и аминокислоты. После часовой инкубации добавляли по 2 мл 15% трихлоруксусной кислоты, гомогенизировали и гомогенат центрифугировали при 1500 об./мин. Из полученной надосадочной жидкости трихлоруксусную кислоту экстрагировали эфиром. ГК и АК определяли электрофоретическим методом при +1—+2° в пиридин-ацетатном буфере (24 мл перегнанного пиридина + 90 мл ледяной уксусной кислоты в 3 литрах воды). Электрофоретический ток подавали 500 в из расчета 2,2 ма на ленту. Ленты проявляли 0,5-процентным раствором нингидрина в ацетоне с добавкой 1,0 мл ледяной уксусной кислоты и 4 мл воды на 100 мл раствора.

Таблица 1

Действие гидроксилламина на содержание аммиака, глутамина, ГК и АК (в мкмольях на 1 г ткани среднее из 5 опытов).

Условия опыта	Азот аммиака		Азот глутамина		ГК		АК	
	без инк.	инк.	без инк.	инк.	без инк.	инк.	без инк.	инк.
Контроль	3,62 ±0,24	8,58 ±0,11 p<0,01	1,62 ±0,15	0,14 ±0,022 p<0,01	18,05 ±0,8	7,18 ±0,18 p<0,01	5,23 ±0,51	12,59 ±1,01 p<0,01
Гидроксилламин 10 мкмоль	3,12 ±0,23 p<0,2	5,32 ±0,4 p<0,01	1,69 ±0,24 p>0,8	1,85 ±0,47 0,02<p<0,05	17,58 ±0,55 p>0,6	17,58 ±0,56 p<0,01	4,18 ±0,32 0,1<p<0,2	4,75 ±0,63 p<0,01

Аммиак определяли диффузионным методом, предложенным Зелигсоном в модификации Силаковой и др. (11).

Количества исследованных веществ выражали в микромолях на 1 г свежей ткани. Количества аммиака и глутамина высчитаны в микромолях азота на 1 г ткани.

В первой серии опытов мы задались целью изучить количественные сдвиги аммиака, ГК, АК в условиях ингибирования переаминирования

гидроксиламино, который, по данным Браунштейна и Азарх, тормозит действие трансаминаз путем связывания альдегидной группы пиридоксальфосфата (12).

Полученные данные (табл. 1) показывают, что гидроксиламин действительно ингибирует переход эндогенной ГК в АК и при этом подавляется также процесс аммиакообразования. Можно было думать о том, что гидроксиламин одновременно тормозит и активность глутамат-дегидрогеназы и выход свободного аммиака из ГК.

Таблица 2

Влияние глутамата и гидроксиламина на содержание аммиака, глутамина, ГК и АК в мозговых срезах крыс (среднее из 6 опытов).

Условия опыта	Азот аммиака	Азот глутамина	ГК	АК
Контроль	8,56 ±0,12	0,1 ±0,004	8,7 ±0,87	10,1 ±0,85
Гидроксиламин 10 мкмоль	6,88 ±0,36 p<0,01	0,78 ±0,028 p<0,01	17,7 ±0,81 p<0,01	4,6 ±0,58 p<0,01
Глутамат 11,8 мкмоль	7,14 ±0,12 p<0,01	0,95 ±0,087 p<0,01	64,6 ±1,92 p<0,01	16,1 ±0,86 p<0,01
Глутамат + гидроксиламин	5,11 ±0,18 p<0,01	1,80 ±0,048 p<0,01	79,2 ±3,02 p<0,01	6,6 ±0,86 p<0,01

Однако в исследованиях мы применяли малые количества гидроксиламина (10 мкмоль), не влияющие на активность глутамат-дегидрогеназы. В специальных опытах мы добавляли гидроксиламин в количестве 5 мкмоль на пробу, т. е. вдвое меньше, и при этом получили тот же эффект. Эти количества гидроксиламина не влияли на активность глутамат-дегидрогеназы и в опытах Катунумы и сстр. (10). Как видно из табл. 1, уровень аммиака в контрольной пробе и в пробе с добавкой гидроксиламина до инкубации почти одинаков, тогда как после инкубации количество аммиака значительно возрастает (почти в 2,5 раза), а в опытной пробе оно повышается в гораздо меньшей степени. Добавление гидроксиламина не вызывает изменений в количестве глутамина в пробах без инкубации. После инкубации в пробах, содержащих гидроксиламин, количество глутамина сильно возрастает.

В процессе инкубации в контрольных пробах значительно возрастает содержание АК за счет ГК. Прирост АК составляет 7,36 мкмоль. Этот факт наводит на мысль, что эндогенная ГК не подвергается прямому деаминированию в условиях нашего опыта и не является источником свободного аммиака.

Исходя из этих данных, во второй серии опытов мы изучали влияние гидроксиламина в присутствии добавленной ГК на количественные сдвиги аммиака. Как видно из табл. 2, при добавлении гидроксиламина количество аммиака понижается, а глутамина возрастает. Как и в преды-

душей серии опытов, значительно подавляется превращение ГК в АК. Добавление ГК, как в предыдущих опытах, несколько уменьшает количество аммиака по сравнению с контрольной пробой и значительно увеличивает количества АК и глутамин. Из той же таблицы видно, что гидроксилламин в присутствии добавленной ГК подавляет образование аммиака, между тем как содержание глутамин повышается в значительной степени. Таким образом, торможение трансминирования ГК и образования из него АК сопровождается понижением выхода свободного аммиака.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в образовании свободного аммиака важную роль играет АК.

Кометиани и сотр. придают большое значение в образовании свободного аммиака аспартату, который с инозин-монофосфатом образует аденило-сукцинат, переходящий в аденозин-монофосфат, а затем в инозин-монофосфат с освобождением аммиака (13).

Однако, как показали исследования Бунятына и Мовсисяна, инозиновая кислота оказалось малоэффективной в образовании аммиака из АК (6).

Таблица 3

Действие хлористого аммония, α -кетоглутарата и гидроксилламина на уровень аммиака, ГК и АК (среднее из 7 опытов)

Условия опыта	Азот аммиака	Азот глутамин	ГК	АК
Контроль без инкубации	5,71 $\pm 0,13$	1,6 $\pm 0,13$	20,2 $\pm 0,61$	6,31 $\pm 0,17$
Контроль инкубированный	11,25 $\pm 0,13$ $p < 0,01$	0,14 $\pm 0,026$ $p < 0,01$	11,0 $\pm 0,28$ $p < 0,01$	11,8 $\pm 0,31$ $p < 0,01$
Хлористый аммоний 20мкмоль	49,05 $\pm 0,77$ $p < 0,01$	0,12 $\pm 0,022$ $p > 0,5$	13,6 $\pm 0,2$ $p < 0,01$	12,0 $\pm 0,13$ $p > 0,5$
Гидроксилламин 10мкмоль	10,71 $\pm 0,18$ $p < 0,01$	1,7 $\pm 0,025$ $p < 0,01$	21,5 $\pm 0,36$ $p < 0,01$	7,26 $\pm 0,09$ $p < 0,01$
Кетоглутарат 20мкмоль	9,99 $\pm 0,11$ $p < 0,01$	0,46 $\pm 0,008$ $p < 0,01$	15,5 $\pm 0,22$ $p < 0,01$	7,8 $\pm 0,15$ $p < 0,01$
Хлористый аммоний + кетоглутарат	48,15 $\pm 0,48$ $p < 0,01$	0,4 $\pm 0,12$ $p < 0,01$	22,0 $\pm 0,53$ $p < 0,01$	7,26 $\pm 0,12$ $p < 0,01$
Хлористый аммоний + кетоглутарат + гидроксилламин	46,4 $\pm 0,47$ $p < 0,01$	1,75 $\pm 0,02$ $p < 0,01$	21,8 $\pm 0,33$ $p < 0,01$	6,9 $\pm 0,085$ $p < 0,01$

Они установили, что никотинамиддинуклеотиды, в частности НАД, в различных тканях (мозг, печень, почки) подвергаются деаминированию и переходят в деамино-формы. На основании полученных результатов они выдвинули следующий механизм образования аммиака из амина-

кислот: аминокислоты → ГК → АК + деамино-НАД⁺ → НАД-сукцинат →
→ НАД + фумарат

↓
деамино-НАД + аммиак.

Результаты, полученные нами, также свидетельствуют о том, что ГК сама по себе не является источником свободного аммиака. Образование аммиака из него осуществляется скорее путем перехода в АК.

Известно, что глутамат-дегидрогеназа играет важную роль в синтезе ГК из аммиака и α-кетоглутарата. Представляло интерес изучить действие гидроксиламина на образование ГК из аммиака и α-кетоглутарата. Поэтому в следующей серии опытов мы задались целью в условиях повышения синтеза ГК проследить за количественными сдвигами аммиака, ГК и АК.

В инкубационную среду добавляли эквивалентные количества α-кетоглутарата и хлористого аммония (табл. 3). Добавление одного хлористого аммония несколько увеличивает ГК и не оказывает особого влияния на уровень АК. При одновременном добавлении α-кетоглутарата и хлористого аммония наблюдается более значительное увеличение ГК, а содержание АК сохраняется на таком же уровне, как и в присутствии кетоглутарата. Низкий уровень АК можно объяснить конкуренцией α-кетоглутарата со щавелевоуксусной кислотой за захват аминогрупп.

В отношении образования глутамина, АК и содержания ГК гидроксиламин с α-кетоглутаратом и хлористым аммонием оказывает тот же эффект, который отмечается в опытах с одним гидроксиламином.

Таблица 4

Действие пирувата на количественные сдвиги аммиака, ГК и АК в срезах головного мозга крыс (среднее из 6 опытов).

Условия опыта	Азот аммиака	Азот глутамина	ГК	АК
Контроль	11,8 ± 0,1	0,36 ± 0,056	9,0 ± 0,18	11,4 ± 0,38
ГК 11,8 мкмоль	10,8 ± 0,19 p < 0,01	0,7 ± 0,55 p < 0,01	67,0 ± 2,64 p < 0,01	17,5 ± 0,38 p < 0,01
Пируват 11,8 мкмоль	9,2 ± 0,3 p < 0,01	1,27 ± 0,019 p < 0,01	19,0 ± 0,6 p < 0,01	7,9 ± 0,53 p < 0,01
ГК + пируват	6,5 ± 0,09 p < 0,01	3,12 ± 0,079 p < 0,01	79,0 ± 1,22 p < 0,01	9,7 ± 1,06 0,2 < p < 0,3

Представляло интерес изучить действие пирувата на образование аммиака в присутствии добавленной ГК. Пируват является одним из источников α-кетоглутарата в срезах мозга, а также в митохондриальных фракциях мозговой ткани и повышает содержание последней (14, 15).

С другой стороны, пируват подавляет окисление α-кетоглутарата в щавелевоуксусную кислоту, что обуславливается конкурентным взаимоотношением между α-кетоглутаратом и пируватом за НАД (14).

Как видно из табл. 4, при добавлении ГК уровень аммиака несколько понижается и как обычно, возрастает количество глутамин и АК.

При добавлении одного пирувата отмечается более заметное понижение содержания аммиака и по сравнению с контрольными опытами значительное повышение уровня глутамин.

При этом повышается содержание ГК, а количество АК снижается, что соответствует данным, полученным Балашем и сотр. (14).

Полученные данные свидетельствуют о том, что при понижении образования АК и при повышении уровня ГК содержание аммиака уменьшается. Это явление более отчетливо проявляется в опытах с добавлением ГК и пирувата вместе, т. е. подавление перехода ГК в АК сопровождается низким образованием аммиака. Следует отметить, что пируват стимулирует синтез глутамин, однако общее содержание азота свободного аммиака и амидной группы глутамин меньше, чем в контрольных опытах.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что в мозговой ткани ГК не является источником свободного аммиака. Наоборот, ему следует приписать роль устранителя аммиака через образование глутамин. Во всех тех случаях, когда ингибируется трансминирование ГК и превращение его в АК, наблюдается пониженное образование аммиака, несмотря на высокий уровень ГК.

Հ. Խ. ԲՈՒՆՅԱՆՔՅԱՆ, Հայկական ՍՍՀ ԳԱ ակադեմիկոս, և Ջ. Հ. ՀԱԿՈՐՅԱՆ,

Գլուտամինաթթուն որպես ազատ ամոնիակի աղբյուր ուղեղային հյուսվածքում

Ուղեղի բիոքիմիայի կարևոր հարցերից մեկը հանդիսանում է ամոնիակի առաջացման և շեղորացման պրոցեսը: Չնայած այդ ուղղությամբ կատարված բազմաթիվ հետազոտություններին, գլուտամինաթթվից ազատ ամոնիակի առաջացման հարցը մնում է վիճելի, հատկապես ուղեղային հյուսվածքում, որտեղ գլուտամատ-դեհիդրոգենազային ակտիվությունը ցածր է և գլուտամինաթթուն հիմնականում փոխարկվում է ասպարազինաթթվի: Հետաքրքրական էր պարզել գլուտամատից ամոնիակի առաջացումը տրանսամինացման պրոցեսների արգելակման դեպքում, երբ ճնշվում է գլուտամինաթթվի անցումը ասպարազինաթթվի: Բացի ամոնիակից ուսումնասիրվել են նաև գլուտամատի, ասպարտատի, ինչպես նաև գլուտամինի քանակական տեղաշարժերը:

Ստացված տվյալները խոսում են այն մասին, որ գլուտամինաթթուն որպես այդպիսին չի հանդիսանում ազատ ամոնիակի առաջացման աղբյուր, ընդհակառակը՝ նա նպաստում է ամոնիակի շեղորացմանը, առաջացնելով գլուտամին: Բոլոր դեպքերում, երբ ընկճվում է գլուտամինաթթվի տրանսամինացումը և բարձրանում է նրա մակարդակը, նկատվում է ամոնիակի քանակի իջեցում:

Ստացված արդյունքները վկայում են այն մասին, որ գլուտամինաթթվից ամոնիակի առաջացումը ուղեղային հյուսվածքում կապված է նրա տրանսամինացման հետ, որի ընթացքում նա հիմնականում փոխանցվում է ասպարազինաթթվի:

ЛИТЕРАТУРА — Գ Ր Ա Կ Ա Ն Ո Ւ Թ Յ Ո Ւ Ն

- ¹ X. Вейл-Малерб, Biochem. J. 30, 665, 1936. ² Фон Г. Эйлер и др. Z. Physiol. Chem. 254, 61, 1938. ³ П. П. Кометиани, Сб. Биохимия нерви. системы, Киев, 1954 ⁴ E. Робинс и др., J. Biol. Chem. 218, 897, 1956. ⁵ П. А. Кометиани и сотр., биох. нерви. и мыш. сист., изд. Мецниереба, Тбилиси, 1965. ⁶ Г. X. Бунятян и С. Г. Мов-

сесян, Вопр. биох. мозга, 2, изд. АН АрмССР, Ереван, 1966. ⁷ Дж. I. Стрекер, Arch Biochem. Biophys. 46, 227, 1953. ⁸ Х. А. Кребс и Д. Беллами, Biochem. J. 75, 521, 1960. ⁹ Р. И. Балаш, Biochem. J. 95, 1965. ¹⁰ Н. Катунума и М. Окада, Proceedings of the Japan Academy, 38, 572, 1962. ¹¹ А. И. Силакова и др., Вопросы мед. химии, 8, 538, 1962. ¹² А. Е. Браунштейн и Р. Азарх, „Биохимия“, 22, 430, 1957. ¹³ П. А. Ко-
метиани, „Биохимия“, 24, 729, 1959. ¹⁴ Р. И. Балаш, J. Neurochem, 12, 63, 1965.
¹⁵ Г. А. Туршян, Вопр. биох. мозга, 2, изд. АН АрмССР, Ереван, 1966.